

[別紙2]

審査結果の要旨

氏名 關 秋明

本研究は細胞染色体複製のS期でDNA損傷によるS期停止を制御するDNA損傷チェックポイント機構を明らかにするため、マウスとラットの繊維芽細胞にて、DNA複製開始複合体の形成に必要なCdc6がDNA損傷によるS期停止からの回復を制御する可能性を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1 S期に入った正常ラット繊維芽細胞(NRK)にMMSを与えて、DNA損傷を引き起こした結果、Chk1のリン酸化、P53およびp21の発現とCdk2活性の消失が見られた。S期進行とCdk2活性はChk1リン酸化シグナル消失の後約10時間で回復した。この結果は、細胞周期はDNA損傷修復終わった後も何らかの原因ですぐ回復できないことを示している。Cdc6はS期停止に伴って著しく分解されて、再発現がS期再開のタイミングと一致したことに注目した。

2 Cdc6がS期再開に関与している可能性を検討した。Cdc6高発現NRK細胞にMMSによるDNA損傷のとき、細胞はS期に停止したが、Chk1のリン酸化シグナルの消失後直ちにS期進行を始めた。P53とP21は野生型NRK細胞と同じように全細胞でまだ大量に発現しているにもかかわらず、Cdc6高発現NRK細胞のCdk2活性は細胞周期回復のタイミングと同じように早く回復した。

3 この現象は特定のDNA障害剤や特定の細胞だけに起こるではないことを確認するために、NRK細胞とCdc6高発現NRK細胞にcisplatinによるDNA損傷及びマウス繊維芽細胞C3H10T1/2とCdc6高発現C3H10T1/2細胞にMMSによるDNA損傷のS期停止と回復を検討した。再び、Cdc6高発現細胞はCdk2の活性化と共にS期停止からの細胞周期の回復が著しく亢進するのを確認した。

4 S期に入ったマウス繊維芽細胞(MEF)とMEFのP21^{-/-}細胞及び野生型Cdk2

と脱リン酸化変異型 Cdk2F15 の高発現 NRK 細胞を用いて検討した結果、MMS による DNA 損傷の時、誘導された P21 が Cdk2 の活性抑制の主たる責任機構であると考えられた。

5 Cdc6 高発現細胞での Cdk2 活性の迅速回復の機構を検討した。 *In Vitro* で合成し、精製した C 末端に His-Tag を付いた Cdc6 を MMS 処理によって S 期に停止した NRK 細胞から免疫沈降した活性のない Cdk2 と精製した Cdc6 を *In Vitro* 反応した所、精製した Cdc6 は ATP 依存的に Cdk2 を活性化できることがわかった。また、ATPase 欠損変異型 Cdc6 は *in vitro* 活性化できないことも判明した。

6 Cdc6 と ATPase 欠損変異型 Cdc6 を tet-off system で発現をコントロールできる細胞内に導入した。MMS による DNA 損傷の時、ATPase 欠損変異型 Cdc6 を大量発現しても Cdk2 の活性化と S 期停止からの細胞周期の回復の亢進が見られなかった。

以上、本論文は Cdc6 が今までよく知られている DNA 複製開始制御因子のほかに、初めて、DNA 損傷による S 期停止の回復を制御する重要な因子であることがわかった。更に、本研究で初めて Cdc6 が Cdk2 を活性化できることを明らかにした。これは Cdc6 と Cdk2 の相互作用ならびに細胞周期制御機構の全貌の解明に新しい突破口を開くものと期待されて、重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。